



भारत का राजपत्र The Gazette of India

असाधारण

EXTRAORDINARY

भाग II—खण्ड 3—उप-खण्ड (ii)
PART II—Section 3—Sub-section (ii)

प्राधिकार से प्रकाशित
PUBLISHED BY AUTHORITY

सं. 2304]

नई दिल्ली, सोमवार, नवम्बर 8, 2010/कार्तिक 17, 1932

No. 2304]

NEW DELHI, MONDAY, NOVEMBER 8, 2010/KARTIKA 17, 1932

कृषि मंत्रालय

(कृषि और सहकारिता विभाग)

अधिसूचना

नई दिल्ली, 8 नवम्बर, 2010

का.आ. 2724(अ).—नियंत्रक उर्वरक (नियंत्रण) आदेश 1985 के खण्ड 29 के उप-खण्ड (2) के अनुसरण में, उर्वरक नमूनों के ठीक विश्लेषण सुनिश्चित करने की दृष्टि से यह विनिर्दिष्ट करते हैं कि उप-खण्ड (1) के अधीन जैव-उर्वरक एवं जैविक उर्वरक के नमूनों के परीक्षण के लिए प्रत्येक अधिसूचित प्रयोगशाला इस अधिसूचना के प्रकाशन की तारीख से एक वर्ष के भीतर, निम्नलिखित न्यूनतम प्रयोगशाला उपकरण और प्रयोगशाला सुविधाएं रखेगी अर्थात् :—

(क) जैव उर्वरकों के परीक्षण नमूनों के लिए उपकरण और अन्य सुविधाएं :—

- | | |
|--|---|
| (1) गर्म वायु ओवन (250 डिग्री सेंटीग्रेड तक) चैम्बर आकार न्यूनतम 24" × 24" × 24" | |
| (2) अनुलम्ब भापसहपात्र | 16" व्यास × 24" ऊंचाई |
| (3) बीओडी उष्मायित्र | क्षमता न्यूनतम 9सीएफटी, 5डि.सें.-50 डि.सें. |
| (4) पीएच मीटर | |
| (5) पटलीय वायु प्रवाह | न्यूनतम 3×2×2 फुट |
| (6) सदृश/कक्षीय उष्मायित्र प्रकंपक | |
| (7) मण्डल गणक अथवा यान्त्रिक गणक युक्ति | |
| (8) सेरोलाजिकल वाटर बाथ | |
| (9) इलेक्ट्रानिक संतुलन | |

(10) जल आसवन इकाई

(11) जेलडाल डाईजेशन इकाई

(12) जेलडाल आसवन समुच्चय

(13) मानक आईएस छलनी

(14) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

360-960 मिमी

(15) दूरबीन अनुसंधान सूक्ष्मदर्शी

40×100X आब्जेक्टिव प्राथमिकता से 10X40 और 100X फेज आब्जेक्टिव वाले फेज कन्स्ट्रास्ट अटैचमेन्ट के साथ

(16) फ्लेम फोटोमीटर

(17) रोटरी प्रकंपक

(18) निर्वात फिल्टरेशन युक्ति

(19) निर्वात पम्प

(20) अर्थन पोद्स

(21) नमूने हेतु कूलिंग भंडार केबिनेट

10-25 डि.सें.

(22) रोटरी निर्वात ड्रायर

(ख) कार्बनिक उर्वरक प्रयोगशालाओं के परीक्षण नमूनों के लिए उपकरण एवं अन्य सुविधाएं :

(1) गर्म वायु ओवन चैम्बर आकार न्यूनतम

24"×24"×24"

(2) रोटरी प्रकंपक

(3) निर्वात फिल्टरेशन यंत्र

(4) निर्वात पम्प

(5) पीएच मीटर

(6) इलेक्ट्रानिक तोलन संतुलन

(7) कन्डक्टिविटी मीटर

(8) फ्लेम फोटोमीटर

(9) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

360-960 मिमी

(10) मफेल फरनेंस

(11) हॉट पलेट कम स्टीरर

(12) आणविक एबजॉप्सन स्पेक्ट्रोफोटोमीटर (एएस)

(13) शीत वाष्प मर्करी विश्लेषक अथवा एएस हेतु वाष्प जेनेरेटर समुच्चय

(14) जेलडाल डाईजेशन इकाई

- (15) जेलडाल आसवन समुच्चय
- (16) एक्जास्ट सुविधा के साथ फ्यूम हुड
- (17) रिफ्लेक्सिंग के लिए सोक्सलेट साधित्र

[फा. सं. 2-1/2010-उर्व. विधि]

संजय विक्रम सिंह, संयुक्त सचिव

MINISTRY OF AGRICULTURE**(Department of Agriculture and Co-operation)****NOTIFICATION**

New Delhi, the 8th November, 2010

S.O. 2724(E).—In pursuance of sub-clause (2) of clause 29 of the Fertiliser (Control) Order, 1985, the Controller with a view to ensure accurate analysis of fertilizer samples, hereby specifies that every laboratory notified for testing the samples of bio-fertiliser and organic fertiliser under sub-clause (1) shall possess within one year from the date of publication of this notification, the following minimum laboratory equipment and other laboratory facilities, namely:—

(A) Equipment and other facilities for testing samples of bio-fertilisers;

- | | |
|--|---|
| (1) Hot air oven (upto 250°C) | chamber size minimum 24" × 24" × 24" |
| (2) Vertical Autoclave | 16" Dia × 24" height |
| (3) BOD incubator | capacity min-9cft., 5°C-50°C |
| (4) pH Meter | |
| (5) Laminar Air Flow | minimum 3 × 2 × 2 ft. |
| (6) Reciprocal/orbital incubator shaker | |
| (7) Colony counter or mechanical counting device | |
| (8) Serological water bath | |
| (9) Electronic balance | |
| (10) Water distillation unit | |
| (11) Kjeldahl digestion unit | |
| (12) Kjeldahl distillation assembly | |
| (13) Standard IS sieve | |
| (14) Spectrophotometer | 360-960nm |
| (15) Binocular research microscope | 40×100X objective, preferably with phase contrast attachments having 10X, 40 X and 100 X phase objectives |
| (16) Flame photometer | |
| (17) Rotary shaker | |
| (18) Vacuum filtration device | |
| (19) Vacuum pump | |
| (20) Earthen Pots | |
| (21) Cooling storage cabinet for samples | 10-25° C |
| (22) Rotary vacuum dryer | |

(B) Equipment and other facilities for testing samples of organic fertilizer laboratories:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| (1) Hot air oven | chamber size minimum 24" × 24" × 24" |
| (2) Rotary shaker | |
| (3) Vacuum filtration device | |
| (4) Vacuum pump | |
| (5) pH Meter | |
| (6) Electronic Weighing balance | |
| (7) Conductivity meter | |
| (8) Flame photometer | |
| (9) Spectrophotometer | 360-960nm |
| (10) Muffel furnace | |
| (11) Hot plate cum stirrer | |
| (12) Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) | |
| (13) Cold vapour Mercury analyzer or vapour generator Assembly for AAS | |
| (14) Kjeldahl digestion unit | |
| (15) Kjeldahl distillation assembly | |
| (16) Fume hood with exhaust facility | |
| (17) Soxhlet apparatus for refluxing | |

[F.No. 2-1/2010-Fert. Law]

SANJAY VIKRAM SINGH, Jt. Secy.

आदेश

नई दिल्ली, 8 नवम्बर, 2010

का.आ. 2725(अ).—केन्द्रीय सरकार, उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 के खण्ड 20क के अनुसरण में राजपत्र में इस अधिसूचना के प्रकाशन की तारीख से तीन वर्ष की अवधि के लिए मैसर्स कोरोमंडल इंटरनेशनल लि., सिकन्दराबाद द्वारा विनिर्मित किए जाने वाले निम्नलिखित अनंतिम उर्वरक के संबंध में विनिर्देश नियत करती है, अर्थात्:—

4% सल्फर से विलेपितडाई अमोनियम फास्फेट

- | | |
|---|------|
| (i) भार के आधार पर आर्द्रता का प्रतिशत, अधिकतम | 1.5 |
| (ii) भार के आधार पर कुल नाइट्रोजन का प्रतिशत, न्यूनतम | 18.0 |
| (iii) भार के आधार पर अमोनिकल नाइट्रोजन का प्रतिशत, न्यूनतम | 15.5 |
| (iv) भार के आधार पर यूरिया के रूप में नाइट्रोजन का प्रतिशत, अधिकतम | 2.5 |
| (v) भार के आधार पर न्यूट्रल अमोनियम साइट्रेट घुलनशील फास्फेट (पी ₂ ओ ₅ के रूप में) का प्रतिशत, न्यूनतम | 46.0 |
| (vi) भार के आधार पर पानी में घुलनशील फास्फेट (पी ₂ ओ ₅ के रूप में) का प्रतिशत, न्यूनतम | 41.0 |
| (vii) भार के आधार पर सल्फर (एस के रूप में) का प्रतिशत, न्यूनतम | 4.0 |
| (viii) भार के आधार पर तात्त्विक सल्फर का प्रतिशत, न्यूनतम | 3.0 |
| (ix) कण आकार—सामग्री का 90 प्रतिशत से अन्यून 4 मि.मी. एस के रूप में भा.मा. छलनी से निकल जाएगा और 1 मि. मी. भा. मा. छलनी पर रह जाएगा। 5 प्रतिशत से अनधिक 1 मि. मी. भा. मा. छलनी से नीचे रहेगा। | |

[फा. सं. 2-1/2010-उर्वरक विधि]

संजय विक्रम सिंह, संयुक्त सचिव

ORDER

New Delhi, the 8th November, 2010

S.O. 2725(E).—In pursuance of clause 20A of the Fertiliser (Control) Order, 1985, the Central Government hereby fixes the specifications in respect of the following provisional fertilizer to be manufactured by M/s. Coromandel International Limited, Secunderabad for a period of three years from the date of publication of this notification in the Official Gazette, namely:—

Di Ammonium Phosphate Coated with 4% Sulphur

(i) Moisture per cent by weight, maximum	1.5
(ii) Total Nitrogen per cent by weight, minimum	18.0
(iii) Ammonical Nitrogen per cent by weight, minimum	15.5
(iv) Nitrogen in the form of urea per cent by weight, maximum	2.5
(v) Neutral ammonium citrate soluble phosphates (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	46.0
(vi) Water soluble phosphates (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	41.0
(vii) Total Sulphur (as S) per cent by weight, minimum	4.0
(viii) Elemental Sulphur (as S) per cent by weight, minimum	3.0
(ix) Particle size—Not less than 90 per cent of the material shall pass through 4 mm IS sieve and shall be retained on 1 mm IS sieve. Not more than 5 per cent shall be below 1 mm IS sieve.	

[F.No. 2-1/2010-Fert. Law]

SANJAY VIKRAM SINGH, Jt. Secy.

अधिसूचना

नई दिल्ली, 8 नवम्बर, 2010

का.आ. 2726(अ).—केन्द्रीय सरकार, आवश्यक वस्तु अधिनियम, 1955 (1955 का 10) की धारा 3 द्वारा प्रदत्त शक्तियों का प्रयोग करते हुए, उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 का और संशोधन करने के लिए निम्नलिखित आदेश करती है, अर्थात् :—

1. (1) इस आदेश का संक्षिप्त नाम उर्वरक (नियंत्रण) (छठा संशोधन) आदेश, 2010 है।

(2) यह राजपत्र में प्रकाशन की तारीख को प्रवृत्त होगा।

2. उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 (इसके पश्चात् उक्त आदेश कहा गया है) की अनुसूची 1 में शीर्षक "उर्वरकों का विनिर्देशन" के अधीन भाग क में उप-शीर्षक 1(छ) "सम्पुष्ट उर्वरक" के अधीन क्र. सं. 06 और उससे संबंधित प्रविष्टियों के पश्चात् निम्नलिखित क्रम संख्यांक और प्रविष्टियां अंतःस्थापित की जाएंगी, अर्थात् :—

"7. जिंक से सम्पुष्ट एनपीके संश्लिष्ट उर्वरक (10:26:26:0.5)

(i) भार के आधार पर आर्द्रता प्रतिशत, अधिकतम	1.5
(ii) भार के आधार पर कुल नाइट्रोजन प्रतिशत, न्यूनतम	10.0
(iii) भार के आधार पर अमोनिकल नाइट्रोजन प्रतिशत, न्यूनतम	7.0
(iv) भार के आधार पर यूरिया नाइट्रोजन (एन के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	3.0
(v) भार के आधार पर न्यूट्रल अमोनियम साइट्रेट घुलनशील फास्फेट (P_2O_5 के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	26.0
(vi) भार के आधार पर पानी में घुलनशील फास्फेट (P_2O_5 के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	20.0
(vii) भार के आधार पर पानी में घुलनशील पोटाश (K_2O के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	26.0
(viii) भार के आधार पर जिंक (जेड एन के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	0.5

4329 66/10-2

कण आकार—सामग्री का 90% से अन्यून 4 मि.मी. भा. मा. छलनी में से छन जाएगा और 1 मि.मी. की भा.मा. छलनी पर रह जाएगा और 5% से अनधिक 1 मि.मी. भा.मा. छलनी से नीचे रहेगा ।

8. जिंक से सम्पुष्ट एनपीके संश्लिष्ट उर्वरक (12:32:16:0:0.5)

(i) भार के आधार पर आर्द्रता प्रतिशत, अधिकतम	1.5
(ii) भार के आधार पर कुल नाइट्रोजन प्रतिशत, न्यूनतम	12.0
(iii) भार के आधार पर अमोनिकल नाइट्रोजन प्रतिशत, न्यूनतम	9.0
(iv) भार के आधार पर यूरिया नाइट्रोजन (एन के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	3.0
(v) भार के आधार पर न्यूट्रल अमोनियम साइट्रेट घुलनशील फास्फेट (पी ₂ ओ ₅ के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	32.0
(vi) भार के आधार पर पानी में घुलनशील फास्फेट (पी ₂ ओ ₅ के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	25.0
(vii) भार के आधार पर पानी में घुलनशील पोटाश (के ₂ ओ के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	16.0
(viii) भार के आधार पर जिंक (जेड एन के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	0.5

कण आकार—सामग्री का 90% से अन्यून 4 मि.मी. भा. मा. छलनी में से छन जाएगा और 1 मि.मी. की भा.मा. छलनी पर रह जाएगा और 5% से अनधिक 1 मि.मी. भा.मा. छलनी से नीचे रहेगा ।

9. बोरोन के साथ कैल्शियम नाइट्रेट

(i) भार के आधार पर कुल नाइट्रोजन न्यूनतम प्रतिशत	14.60
(ii) भार के आधार पर अमोनिकल नाइट्रोजन प्रतिशत, न्यूनतम	1.1
(iii) भार के आधार पर एन के रूप में नाइट्रेट नाइट्रोजन, न्यूनतम	13.5
(iv) भार के आधार पर पानी में घुलनशील कैल्शियम प्रतिशत के रूप में, न्यूनतम	17.1
(v) भार के आधार पर बोरोन (बी के रूप में) प्रतिशत, न्यूनतम	0.250''

3. उक्त आदेश की अनुसूची III में,—

(क) “जैव उर्वरकों के विनिर्देश” शीर्षक के अधीन भाग क में क्रम सं. 4 एवं उससे संबंधित प्रविष्टियों के पश्चात् निम्नलिखित क्रम सं. और प्रविष्टियां जोड़ी जाएंगी, अर्थात् :—

“5. माइकोरिजल जैव उर्वरक

(i) फार्म/आधार	वार्धन सब्सट्रेट के साथ मिलाया गया बारीक चूर्ण/टिकिया/दाने/जड़ीय बायोमास
(ii) वाहक आधारित चूर्ण सामग्री के कण आकार	250 माइक्रोन भा. मा. छलनी (60 बीएसएस) में से 90% निकल जाएगा।
(iii) अधिकतम नमी अंतर्वस्तु प्रतिशत	8-12
(iv) पी एच	6.0 से 7.5
(v) उत्पाद के कुल व्यवहार्य/प्रोपेग्यूलस प्रति ग्राम न्यूनतम	तैयार उत्पाद का 100 ग्राम
(vi) संक्रमणता क्षमता	उपयोग किए गए माइकोरिजल इनोकुलम के परीक्षण जड़ प्रति ग्राम में 80 संक्रमणता पाइन्ट्स”

(ख) भाग ख में, जैव उर्वरकों की सहिष्णुता सीमा "शीर्षक" के अधीन, "चूर्ण या दानेदार के रूप में वाहक सामग्री का 1×10^7 सीएफयू/ग्राम अथवा तरल सामग्री का 5×10^7 सीएफयू/एमएल" अंक और शब्द के स्थान पर निम्नलिखित रखा जाएगा, अर्थात् :—

"1. राइजोबियम, एजोटोबैक्टर, एजोसपिरिलम एवं फास्फेट घुलनशील बैक्टीरिया के मामले में शैल्फ लाईफ की संपूर्ण अवधि के दौरान कुल व्यवहार्य गिनती चूर्ण या दानेदार के रूप में वाहक सामग्री के 1×10^7 सीएफयू/ग्राम अथवा तरल सामग्री के मामले में 5×10^7 सीएफयू/एमएल से कम नहीं होगी।

2. माइकोरिजल जैव उर्वरकों के मामले में, व्यवहार्य प्रोपेग्यूलस उत्पाद के प्रति ग्राम में उत्पाद के 80/ग्राम से कम नहीं होगा।"

(ग) भाग घ में शीर्षक "जैव उर्वरकों के विश्लेषण की विधि" के अधीन उप-शीर्षक "1 डी फास्फेट घुलनशील बैक्टीरियल जैव उर्वरकों के विश्लेषण की विधि" एवं उसमें संबंधित प्रविष्टियों के पश्चात् निम्नलिखित उप-शीर्षक और प्रविष्टियां अंतस्थापित की जाएंगी, अर्थात् :—

"1ई माइकोरिजल जैव उर्वरकों के विश्लेषण की विधि :

1. पी एच का प्राक्कलन

जैसा अनुसूची IV भाग घ में क्रम सं. 1 में विनिर्दिष्ट है।

2. नमी अंतर्वस्तु का प्राक्कलन

जैसा कि एफसीओ 1985 की अनुसूची IV भाग घ में क्रम सं. 2 में विनिर्दिष्ट है।

3. कुल व्यवहार्य प्रोपेग्यूलस का प्राक्कलन।

3.1 तैयार उत्पाद से बीजाणुओं का संचयन

क. छानकर

(क) उपकरण तथा अभिकर्मक.—नायलोन या स्टेनलैस स्टील की जाली वाली डण्डी युक्त छलनियां और कैरियर अथवा मृदा नमूने से पृथक्करण बीजाणुओं के छिद्र आकारों की बड़ी रेंज।

i. छोटे आकार वाले बीजाणुओं के लिए 40-50 माइक्रोन (0.04 एमएम) छलनी।

ii. मध्यम आकार के बीजाणुओं के लिए 100 माइक्रोन (0.04 एमएम) छलनी।

iii. बहुत बड़े आकार के बीजाणुओं तथा स्पोरोकार्पस के लिए 250 माइक्रोन (0.25 एमएम) छलनी।

iv. पानी वाली धुलाई की बोतलें।

v. छनी सामग्री को एकत्र करने के लिए मर्तबान।

vi. स्टोरियो जूम (स्टेरियामाइक्रोस्कोप)

vii. छने पदार्थ को स्टेरियामाइक्रोस्कोप के नीचे देखने के लिए पेट्री डिसेज (11 सेमी.)

viii. बीजाणुओं को उठाने के लिए माइक्रोपिपेटस

ix. अपकेन्द्रित (सेन्ट्रीफ्यूज)

(ख) प्रक्रिया : मिट्टी को पानी की पर्याप्त मात्रा में मिलाएं और जाली आकार के घटते क्रम में व्यवस्थित की गई शृंखलाबद्ध छलनियों के माध्यम से निस्तारण करें। जड़ें और मोटा कचरा एक मोटी (60-आईएसएस) छलनी पर एकत्रित हो जाता है, जबकि बीजाणु एक या अधिक बारीक छलनियों पर अभिग्रहण हो जाते हैं। बीजाणुओं को चिकनी मिट्टी या जैविक सामग्री के समूहों से मुक्त करने के लिए पानी से अच्छी तरह से सफाई किया जाना आवश्यक है। छनी हुई सामग्री को मर्तबान में एकत्र करें। छनी हुई सामग्री को ग्रीडेड पेट्री डिसेज/प्लेट पर स्थानांतरित करें और स्टोरियोमाइक्रोस्कोप से देखें। प्लेट/डिश में बीजाणुओं की गिनती करें और इसे नमूने के प्रतिग्राम बीजाणु के रूप में व्यक्त करें।

ख. स्यूक्रोस अनुपात द्वारा—

i. उपर्युक्त वर्णित पद्धति से छनी हुई सामग्री एकत्र करें। छनी हुई सामग्री को अपकेन्द्रित ट्यूबों में स्थानांतरित करें और क्षैतिज रोटार में 1,750 आरपीएफ पर 5 मिनट के लिए अपकेन्द्रित करें।

ii. प्लावी तरल पदार्थ को ध्यानपूर्वक निस्तारित करें और 60% स्यूक्रोस घोल में पेल्लेट को रीसस्पेंड करें। 2-5 मिनट के लिए फिर से अपकेन्द्रित करें।

- iii. 300 बीएसएस छलनी आकार पर प्लावी (बीजाणुओं के साथ) को डालें और चीनी को हटाने के लिए पानी से साफ करें। छनी सामग्री को ग्रीडेड पेट्री डिसेज/प्लेट पर स्थानांतरित करें तथा स्टीरियोमाइक्रोस्कोप में देखें। प्लेट/डिश में बीजाणुओं की गिनती करें तथा इसे नमूने के प्रतिग्राम बीजाणुओं के रूप में व्यक्त करें।

3.2 बीजाणु अभिरंजक

(क) उपकरण एवं अभिकर्मक

- (1) पीछे यथावर्णित बीजाणु निष्कर्षण हेतु उपकरण एवं अभिकर्मक
- (2) 2, 5 डाईफिनाइल-2 एन-टेट्राजोलियम ब्रोमाइड (एमटीटी)
- (3) आसवित पानी
- (4) एप्पेन्डोफ
- (5) स्टीरियोमाइक्रोस्कोप
- (6) पेट्री डिसेज

(ख) प्रक्रिया

- i. एमएमटी (2, 5-डाईफिनाइल-2 एन-टेट्राजोलियम ब्रोमाइड) का 25% घोल तैयार करें।
- ii. एमएमटी घोल को प्रकाश के सामने लाने से बचें, क्योंकि स्टेन प्रकाश संवेदनशील होता है।
- iii. उपर्युक्त वर्णित दो पद्धतियों से किसी एक द्वारा ताजे एकत्रित एएमएफ बीजाणुओं (लगभग 100 की संख्या में) को स्टेनिंग घोल में मिलाएं और अंधेरे में जीवाणुहीन (स्टेराइल) एप्पेन्डोफ में 27 से. पर उष्मायन करें।
- iv. अंधेरे स्थान पर 24 घंटों, 48 घंटों और 72 घंटों के इन्क्यूनेशन के स्टीरियोमाइक्रोस्कोप का उपयोग करते हुए अलग-अलग रंग प्रतिक्रियाओं के लिए बीजाणुओं का अवलोकन करें।
- v. निम्नलिखित सूत्र के अनुसार लाल या गुलाबी रंग हो जाने वाले बीजाणुओं को व्यवहार्य माना जाता है।

$$\% \text{ बीजाणु व्यवहार्यता} = \frac{\text{लाल या गुलाबी होने वाले बीजाणुओं की सं.} \times 100}{\text{बीजाणुओं की कुल संख्या}}$$

4. संक्रमकता संभावना सिद्धांत का आकलन :—उत्पाद में विद्यमान प्रोपेग्यूलस की संख्या निर्धारित करने के लिए बायोएस्सी उपयोग की जाती है। जब भी संक्रमित प्रोपेग्यूलस रूट में (बीजाणु, लाइसेलिया और वेसिकल्स) परपोषी (हास्ट) कट के संपर्क में आते हैं तो वे ट्राजिड माइसेलिया ढाचे एप्रेसेरिया, जो कि एक प्रवेश (पेनेट्रेशन) इवेंट में प्रारंभिक कदम है, को तैयार करते हैं। यह एप्रेसेरिया एक प्रवेश प्वाइंट के जरिए कट में प्रवेश करता है। इस प्रवेश प्वाइंट को धब्बे के रूप में स्पष्ट रूप से देखा जा सकता है और इनुकुलम की संक्रमणता के एक उपाय के रूप में परिकलित किया जा सकता है। हास्ट प्लांटस को पूर्व अंकुरित बीजों से उगाया जाता है और इनुकुलम को ज्ञात भार बर्तनों में प्रायोगिक हास्ट प्लांटस पर लगाया जाता है। ये बर्तन 14 दिनों के लिए पेंटें किए जाते हैं। जिसके पश्चात् उन्हें हार्वेस्ट किया जाता है, जड़ों की लंबाई मापी जाती है और तब अभिरंजक किया जाता है। संक्रमणता संभाव्यता सुनिश्चित करने के लिए परिणामी प्रवेश बिंदुओं की गिनती की जाती है।

(क) उपकरण और अभिकर्मक

- (क) बर्तन (आकार में 5×7 से.मी.)
- (ख) सोरघम बीज (सोरघम बुलगारे)
- (ग) कोंचिया और नीडल्स
- (घ) पेट्री डिश (ग्रीडेड)
- (ङ) वाटर बाथ
- (च) ग्लास स्लाइड्स और कवर स्लिप्स
- (छ) कम्पाउंड माइक्रोस्कोप
- (ज) धोने/घोल परिवर्तित करने के दौरान रूट लॉस रोकने के लिए मोटा छानना।

- (झ) 50% ग्लाइसिरोल में अभिरंजक नमूनों के भण्डारण हेतु टाइट-सिलिंग ढक्कन वाले प्लास्टिक बायल्स
- (ज) पोटैसियम हाइड्रोआक्साइड घोल (5-10%)
- (ट) अलकालिन एच 2 ओ 2 (25% अमानिया घोल: 3 एमएल+10% एच2 ओ 2 : 30 एमएल+डिस्टिल्ड वाटर 67 एमएल)
- (ठ) 1% एचसीएल
- (ड) अभिरंजक रूटस के डी-स्टेनिंग और भण्डारण के लिए 50% ग्लिसेरोल वाटर (वी/वी) घोल
- (ढ) लेक्टोग्लिसेरोल (लेक्टिक अम्ल : 876 एमएल + ग्लिसरीन : 64 एमएल + डिस्टिल्ड वाटर : 60 एमएल)
- (ख) अभिरंजन घोल**
- (क) 0.01% अम्ल फसचिन 100 एमएल एसेटोग्लाइसेरोल में 0.01 ग्राम अम्ल फसचिन
- (ख) 0.05% ट्रिपान ब्ल्यू 100 एमएल एसेटोग्लाइसेरोल में 0.05 ग्रा. ट्रिपान ब्ल्यू
- (ग) लैक्टोग्लाइसेरोल में 0.03% क्लोरोजोल ब्लैक (ई) (सीबीई) (1 : 1 : 1 लैक्टिक अम्ल, ग्लाइसेरोल एण्ड वाटर)
- (घ) लैक्टिक अम्ल और ग्लाइसेरोल की बराबर मात्रा मिलाने से पहले सीबीई पानी में घोलें।
- (ग) प्रक्रिया**
- (i) एक बर्तन में 100 ग्राम परीक्षण नमूना डालें
- (ii) यदि इनोकुलम काफी गाढ़ा है तो स्टेरिलाइस्ड ब्ल्यू के साथ इनाकुलम को तनुकृत करें।
- (iii) सोरघम के पूर्व अंकुरित बीजों को रोपें और 14 दिनों के लिए उगाएं।
- (iv) बर्तनों को हटाएं और जड़ों को निकालें (छलनी का उपयोग करके बारीक जड़ों को बचाया जा सकता है।
- (v) जड़ों की लम्बाई में बराबर 1 से.मी. काटें।
- (vi) प्रत्येक सैम्पल/अवमिश्रण से जड़ की लम्बाई को मापे अभिलिखित करें (नीचे वर्णित ग्रिड लाइन इन्टरसेक्ट पद्धति का उपयोग करके)
- (vii) केओएच घोल में जड़ों को साफ करें और जड़ के टुकड़ों को स्टेन करें (नीचे वर्णित किया गया है)।
- (viii) यादाच्छिक रूप से उठाए गए 100 खण्डों पर बने संक्रमण बिन्दु/प्रवेश बिन्दुओं की संख्या की गिनती करें।
- (ix) 1 से. मी. सेगमेन्ट में बने सभी प्रवेश बिन्दुओं की औसत संख्या की गणना।
- (x) संक्रमित बिन्दुओं/संक्रमित प्रोपेग्यूलस (आईपी) की कुल संख्या की गणना 1 से. मी. सेगमेन्ट में बने प्रवेश बिन्दुओं की औसत संख्या को कुल लम्बाई से गुणा करके निकालें।
- (xi) सबस्ट्रेट/इनोकुलम की प्रति ग्राम संख्या के रूप से विद्यमान आईपी का बहिर्वेशन करें।
- (घ) जड़ लम्बाई का प्राक्कलन**
- (1) उपकरण
- (क) कैंची
- (ख) पेट्री डिश (1.33 से.मी. 1.33 ग्रिड वाली 9 सेंमी. आकार)
- (ग) वाश बोतल
- (घ) स्टीरियो जूम माइक्रोस्कोप

(2) लाइन इन्टरसेक्ट पद्धति का उपयोग कवक और जड़ की लम्बाई के आकलन के लिए किया जाता है। जड़ की लम्बाई किसी ट्रे के पेन्डे पर स्ववायर ग्रिड में जड़ों को फैलाकर मापी जाती है। जड़े 2 एमएम से 10 एमएम गहरे जल में ग्रिड में अलग-अलग फैल जाती हैं। पर्यवेक्षक की आंखें ग्रिड की सभी होरीजोन्टल एवं वर्टिकल लाइन का कास्ट करती हैं एवं जड़ की हस्तचालित क्लिक से गणना की जाती है।

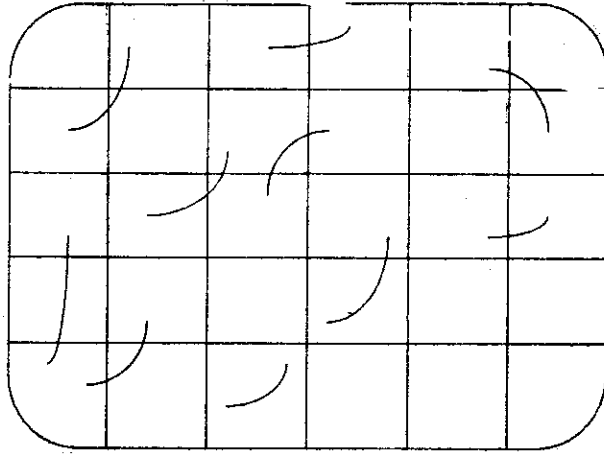
4329 9/10-3

जड़ की लम्बाई की निम्न प्रकार से गणना की जाती है :—

जड़ की लम्बाई = इन्टरसेक्ट की सं. X 11/14X ग्रिड का आकार

जहाँ, 11/14 स्थिर है, ग्रिड का आकार ग्रिड के एक स्क्वायर की लम्बाई है।

- (क) ग्रिड लाइन्स के साथ डिश में रेन्डम विक्षेप।
 (ख) होरिजोन्टल एवं वर्टिकल लाइन्स के आर-पार जड़ों पर इन्टरसेक्ट की गणना।
 (ग) 10 रूट सेमेन्ट का एक उदाहरण प्रस्तुत किया गया है ताकि जड़ की लम्बाई की गणना किस प्रकार की जाती है, को प्रदर्शित किया जा सके।



होरिजोन्टल इन्टरसेक्ट (एच I)
2
2
2
2
(कुल 8 एच I)

वर्टिकल इन्टरसेक्ट (वीI)
2
1
2
0
2

इन्टरसेक्ट की कुल संख्या = एचI+वीI = 8+7 (उदाहरण) = 15 इस प्रकार जड़ की कुल लम्बाई = $11/14 \times 15 \times 1$ (जैसा कि ग्रिड आकार 1 से.मी. है) 11 से.मी. (उदाहरण)

(3) जड़ नमूना की सफाई एवं अभिरंजन :—सफाई एवं अभिरंजन प्रक्रिया के लिए ऐसे जड़ नमूनों की आवश्यकता होती है और जिन्हें मृदा रहित शोधित होना चाहिए। यह महत्वपूर्ण है कि केओएच और अभिरंजन मिश्रण की मात्रा प्रसंस्कृत की जा रही मात्रा के लिए पर्याप्त है और जड़ें मिश्रण हेतु एकीकृत सम्पर्क हुए झुरमुट में नहीं होनी चाहिए। समरूप अभिरंजन को सुनिश्चित करने के लिए जड़ों को छोटे (1-2 से.मी.) के आकार को काटा जाना चाहिए।

- (क) जड़ों के नमूनों को चालू नल के नीचे साफ करें। अब इसे 5-10 प्रतिशत केओएच मिश्रण वाले बीकर में लगभग 15-30 मिनट तक रखें। केओएच के सांद्रण और जड़ों का उष्मायन का समय जड़ों की आयु एवं कोमलता पर निर्भर है।
 (ख) केओएच मिश्रण को उड़ेलिए और नल के पानी से कम से कम बीकर में तीन बार साफ करें अथवा पानी में भूरा रंग जब तक साफ ना हो जाए तब तक साफ करें।
 (ग) जड़ों को अल्कालाइन एच₂ओ₂ से 10 मिनट तक सामान्य तापमान पर आच्छादित करें अथवा जब तक जड़ें विरंजित न हो जाएं।
 (घ) जड़ों से एच₂ओ₂ को हटाने के लिए उन्हें कम से कम तीन बार नल के पानी से साफ करें।
 (ङ) जड़ों को 1% एचसीएल से आच्छादित करें एवं 3-4 मिनट तक भिगोयें। इसके बाद मिश्रण को उड़ेल दें। इसके पश्चात् साफ करें क्योंकि नमूनों की सही अभिरंजन करने के लिए इन्हें अम्लीकृत किया जाना चाहिए।

(च) अभिरंजन घोल से जड़ों को उष्मायित करें (लेक्टोग्लाइसेरोल में 0.01% अम्ल फचसाइन अथवा लेक्टोफेनोल में 0.05% ट्राइपन ब्ल्यू) और उसे साफ करने के लिए रात भर रखें।

(छ) जड़ नमूनों को ग्लास पेट्रीप्लेट/मल्टीवेल प्लेट में डिस्टेनिंग सोल्यूसन (50% ग्लाइसेरोल) चौथे स्तर पर उपयोग की जाने वाला मानक है लेकिन यह अभिरंजन के बिना अभिरंजनक है।

(4) नमूना संग्रहण एवं स्लाइड तैयार करना :—(1) यदि सफाई एवं शोधन तुरन्त संभव ना हो तो ताजा जड़ों को नम एवं 5 डिग्री सेल्सियस पर रखा जा सकता है (अनेक दिनों के लिए) अथवा कसे हुए सीलयुक्त कूपक में 50% एथनाल में महीनों तक संरक्षित रखा जा सकता है।

(2) पर्यवेक्षण से पहले कई मास तक 50% ग्लाइसेरोल में जड़ों की डिस्टेनिंग द्वारा अभिरंजन गुणवत्ता में तदनन्तर सुधार किया जाता है ताकि जड़ों से अधिक स्टेन का निक्षालन किया जा सके।

पीवीएलजी माउन्टेन्ट्स से अभिरंजन जड़ों की अर्द्ध स्थायी स्लाइड्स बनाई जा सकती है। अस्थायी स्लाइड के लिए अभिरंजन पाली जड़ों को केवल लेक्टोग्लाइसेरोल में पर्यवेक्षण किया जा सकता है।

[फा. सं. 2-1/2010-उर्वरक विधि]

संजय विक्रम सिंह, संयुक्त सचिव

पाद टिप्पण :—उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 सा.का.नि. 758(अ), तारीख 25 सितम्बर, 1985 द्वारा भारत के राजपत्र में प्रकाशित किया गया था और अंतिम बार सं. का.आ. 2024(अ), तारीख 17-8-2010 द्वारा संशोधित किया गया था।

NOTIFICATION

New Delhi, the 8th November, 2010

S.O. 2726(E).—In exercise of the powers conferred by Section 3 of the Essential Commodities Act, 1955 (10 of 1955), the Central Government hereby makes the following Order further to amend the Fertiliser (Control) Order, 1985, namely :—

1. (1) This Order may be called the Fertiliser (Control) (Sixth Amendment) Order, 2010.

(2) It shall come into force on the date of its publication in the Official Gazette.

2. In Schedule I of the Fertiliser (Control) Order, 1985 (hereinafter referred to as the said order) in Part A, under the heading "Specification of Fertiliser", in sub-heading 1 (g) "Fortified Fertilisers", after serial number 6 and entries relating thereto, the following serial number and entries shall be inserted, namely :—

"7. NPK Complex Fertiliser Fortified with Zinc (10 : 26 : 26 : 0.5)

(i)	Moisture per cent by weight, maximum	1.5
(ii)	Total nitrogen per cent by weight, minimum	10.0
(iii)	Ammonical nitrogen per cent by weight, minimum	7.0
(iv)	Urea nitrogen (as N) per cent by weight, maximum	3.0
(v)	Neutral ammonium citrate soluble phosphate (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	26.0
(vi)	Water soluble phosphate (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	20.0
(vii)	Water soluble potash (as K_2O) per cent by weight, minimum	26.0
(viii)	Zinc (as Zn) per cent by weight, minimum	0.5

Particle size—Not less than 90 per cent of the material shall be retained between 1 mm and 4 mm IS sieve and not more than 5 per cent shall be below 1 mm IS sieve.

“8. NPK Complex Fertiliser Fortified with Zinc (12 : 32 : 16 : 0 : 0.5)

(i)	Moisture per cent by weight, maximum	1.5
(ii)	Total nitrogen per cent by weight, minimum	12.0
(iii)	Ammonical nitrogen per cent by weight, minimum	9.0
(iv)	Urea nitrogen (as N) per cent by weight, maximum	3.0
(v)	Neutral ammonium citrate soluble phosphate (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	32.0
(vi)	Water soluble phosphate (as P_2O_5) per cent by weight, minimum	25.0
(vii)	Water soluble potash (as K_2O) per cent by weight, minimum	16.0
(viii)	Zinc (as Zn) per cent by weight, minimum	0.5

Particle size—Not less than 90 per cent of the material shall be retained between 1mm and 4 mm IS sieve and not more than 5 per cent shall be below 1 mm IS sieve.

9. Calcium Nitrate with Boron

(i)	Total nitrogen per cent by weight, minimum	14.60
(ii)	Ammonical nitrogen per cent by weight, minimum	1.1
(iii)	Nitrate nitrogen as N per cent by weight, minimum	13.5
(iv)	Water soluble Calcium as per cent by weight, minimum	17.1
(v)	Boron (as B) per cent by weight, minimum	0.250

3. In Schedule III of the said Order,

- (a) in Part A under the heading “SPECIFICATIONS OF BIOFERTILIZERS,” after serial number 4 and entries relating thereto, the following serial number and entries shall be added, namely :—

“5. Mycorrhizal Biofertilisers

(i)	Form/base	Fine powder/tablets/granules/root biomass mixed with growing substrate
(ii)	Particle size for carrier based	90% should pass through 250 micron IS sieve powder formulations (60 BSS)
(iii)	Moisture content per cent maximum	8-12
(iv)	pH	6.0 to 7.5
(v)	Total viable propagules/gm of product, minimum	100/gm of finished product
(vi)	Infectivity potential	80 infection points in test roots/gm of mycorrhizal inoculum used”

- (b) in Part B under the heading “TOLERANCE LIMIT OF BIOFERTILISERS”, for the figures and words 1×10^7 CFU/g of carrier material in form of powder or granules or 5×10^7 CFU/gm of liquid material, the following shall be substituted, namely :—

“1. In case of Rhizobium, Azotobacter, Azospirillum and Phosphate Solubilising Bacteria, the total viable count shall not be less than 1×10^7 CFU/gm of carrier material in the form of powder or granules or 5×10^7 CFU/ml in case of liquid formulations during the entire period of shelf life.

2. In case of Mycorrhizal Biofertilisers, the viable propagules shall not be less than 80.”

- (c) in Part D under the heading “Method of Analysis of Biofertilisers” after sub-heading “1D, Method of Analysis of Phosphate Solubilising Bacterial Biofertilisers” and entries relating thereto the following sub-heading and entries shall be inserted, namely :—

"IE Method of Analysis for Mycorrhizal Biofertilisers

1. Estimation of pH
As specified in Schedule IV Part D at serial number 1.
2. Estimation of moisture contents
As specified in Schedule IV Part D at serial number 2 of Fertiliser (Control) Order 1985.
3. Estimation of total viable propagules
3.1. Harvesting of spores from finished product.

A. By sieving

- (a) **Equipment and Reagent** :—Stalking sieves with nylon or stainless steel mesh and a large range of pore sizes of isolating spores from the carrier or soil sample.
 - (i) 40-50 micron (0.04 mm) sieve for small sized spores.
 - (ii) 100 micron (0.14 mm) sieve for medium sized spores.
 - (iii) 250 micron (0.25 mm) sieve for very large sized spores and sporocarps.
 - (iv) Wash bottles containing water.
 - (v) Jars for collecting the sieving.
 - (vi) Stereo zoom (stereomicroscope).
 - (vii) Petri dishes (11 cm) for observing the sieving under stereomicroscope.
 - (viii) Micropipettes for spore picking.
 - (ix) Centrifuge.
- (b) **Procedure**.—Mix the soil in a substantial volume of water and decant through a series of sieves arranged in descending order of mesh size. Roots and coarse debris are collected on a coarse (60-ISS) sieve, while spores are captured on one or more finer sieves. Vigorous washing with water is necessary to free spores from aggregates of clay or organic materials. Collect the sieving in jars. Transfer the sieving onto the grided petri dishes/plate and observe under stereomicroscope. Count the number of spores in plate/dish and express it as spores/g of the sample.

(B) By sucrose gradient

- (i) Collect the sieving by the method described above. Transfer the sieving into centrifuge tubes and centrifuge for 5 minutes at 1,750 rpm in a horizontal rotor.
- (ii) Decant the supernatant liquid carefully and resuspend pellet in 60% sucrose solution. Again centrifuge for 2-5 minutes.
- (iii) Pour the supernatant (with spores) onto a 300 BSS sieve size and rinse with water to remove the sugar. Transfer the sieving onto the grided petri dishes/plate and observe under stereomicroscope. Count the number of spores in plate/dish and express it as spores/g of the sample.

3.2 Spore staining**(a) Equipment and Reagent**

- (1) Equipments and reagents for spore extraction as described previously.
- (2) 2,5-diphenyl -2N-tetrazolium bromide (MTT)
- (3) Distilled water
- (4) Eppendorf
- (5) Stereomicroscope
- (6) Petri-dishes

(b) Procedure

- (i) Prepare 0.25% solution of MTT (2,5-diphenyl -2N-tetrazolium bromide).
- (ii) Avoid exposure of MTT solution to light, as the stain is light sensitive.

4329 9710-4

- (iii) Add freshly collected AMF spores (approximately 100 in number) collected by any of the two methods described above, to the staining solution and incubate at 27°C in sterile eppendorf in dark.
- (iv) Observe the spores for different colour reactions using stereomicroscope under dark field after 24 hours, 48 hours and 72 hours of incubation.
- (v) Spores, which stained red or pink, are treated as viable, as per the following formulae :

$$\% \text{ Spore viability} = \frac{\text{No. of spores which stained red or pink} \times 100}{\text{Total number of spores.}}$$

4. Assessment of Infectivity Potential :—The bioassay is used to determine the number of infective propagules present in the product. Once the infective propagules (spores, mycelia and vesicles in the root fragments) come in contact with the host roots they give out a turgid mycelial structure—the appressoria, which is the initial step in the penetration event. This appressoria enters the root through an entry point. This entry point can be visualized by staining and enumerated as a measure of the infectivity of the inoculum. Host plants are grown from pre germinated seeds and a known weight of the inoculum is applied to experimental host plant in pots. These pots are maintained for 14 days after which they are harvested, the root length measured and then stained. The resulting entry points are counted to ascertain the infectivity potential.

(A) Equipments and Reagents

- (a) Pots (5 × 7 cm in size)
- (b) Sorghum seeds (*Sorghum vulgare*)
- (c) Scissors and needles
- (d) Petri dish (grided)
- (e) Water bath
- (f) Glass slides and cover slips
- (g) Compound microscope
- (h) Coarse sieve to prevent root loss during washing/changing solutions
- (i) Plastic vials with tight-sealing lids for storage of stained samples in 50% glycerol
- (j) Potassium hydroxide solution (5-10%)
- (k) Alkaline H₂O₂ (25% Ammonia solution: 3 ml + 10% H₂O₂ : 30 ml + Distilled water 67 ml)
- (l) 1% HCl
- (m) 50% glycerol-water (v/v) solution for de-staining and storage of stained roots.
- (n) Lactoglycerol (Lactic acid : 876 ml + Glycerine: 64 ml + Distilled water: 60 ml)

(B) Staining solutions

- (a) 0.01 % acid fuchsin: 0.01 g acid fuchsin in 100ml acetoglycerol.
- (b) 0.05% trypan blue: 0.05 g trypan blue in 100ml acetoglycerol.
- (c) 0.03% Chlorozol black E (CBE) in lactoglycerol (1:1:1 lactic acid, glycerol and water).
- (d) Dissolve CBE in water before adding equal volumes of lactic acid and glycerol.

(C) Procedure

- (i) Place 100 g test sample in a pot
- (ii) Dilute the inoculum with sterilized sand if the inoculum is very rich
- (iii) Plant 10-12 pre germinated seeds of Sorghum and grow for 14 days
- (iv) Harvest the pots and recover roots (fine roots can be rescued using sieve) completely.
- (v) Chop the roots equally 1 cm in length.
- (vi) Measure and record the root length (using grid line intersect method described below) from each sample/dilution.
- (vii) Clear the roots in KOH solution and stain the root pieces (described below)
- (viii) Count the number of infection points/entry points formed on randomly picked 100 segments

- (ix) Calculate the average number of entry points formed in 1 cm segment.
- (x) Calculate the total number of infection points/infective propagules (IP) by multiplying the average number of entry points formed in 1 cm segment by the total root length.
- (xi) Extrapolate the IP present as numbers per gram of substrate/inoculum.

(D) Estimation of root length**(1) Equipment**

- (a) Scissors
- (b) Petri dish (9 cm in size consisting 1.33 cm × 1.33 cm grids)
- (c) Wash bottle
- (d) Stereo zoom microscope

(2) The lines intersect method is used to estimate the length of hyphae and roots. Root length is measured by dispersing roots against a grid of squares on the bottom of a tray. The roots are spread apart from one another over a grid in 2 mm to 10-mm depth of water. The eyes of the observer are cast along all the horizontal and vertical lines of the grid and root is counted using a hand held click counter.

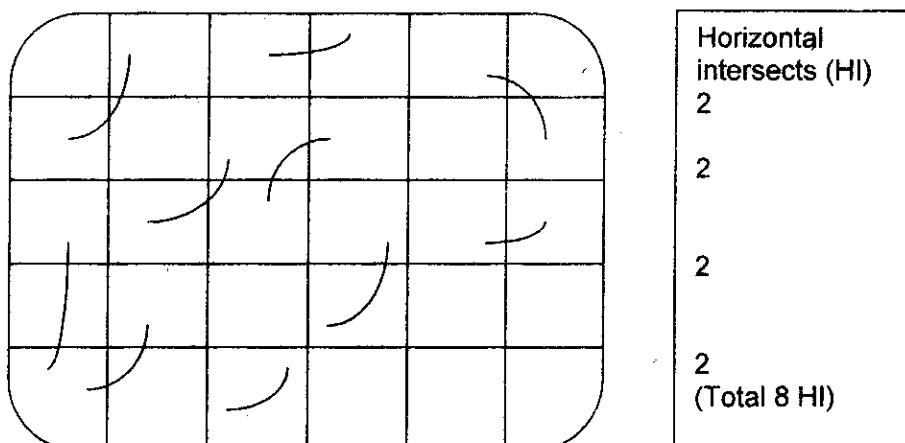
The root length is calculated as follows:

$$\text{Root length} = \text{No. of intersects} \times 11/14 \times \text{grid size}$$

Where, 11/14 is a constant, and the size of the grid is the length of one side of one square of the grid.

Counting root intersections

- (a) Randomly disperse root in dish with grid lines.
- (b) Count the intersects on roots across the horizontal and vertical lines.
- (c) An example of 10 root segments is presented to show how the root length is calculated :



Vertical intersects (VI) = 7					
2	1	2	0	2	

$$\text{Total number of intersects} = \text{HI} + \text{VI} = 8 + 7 (\text{example}) = 15$$

$$\text{Thus, the root length} = 11/14 \times 15 \times 1 (\text{as the grid size is 1cm}) = 11 \text{ cm (example)}$$

- (3) **Clearing and staining root specimens**—Clearing and staining procedures requires root samples that should be washed free of soil. It is important that KOH and staining solution volumes are sufficient for the amount of roots being processed and that, roots are not tightly clumped together for uniform contact with solutions. To ensure uniform staining, the roots should be chopped into smaller (1-2 cm) segments.

- (a) Wash root specimens under running tap water thoroughly. Place them in beaker containing 5-10% KOH solution for about 15-30 minutes. The concentration of KOH and time of incubation of roots depend upon the age and tenderness of the roots.
 - (b) Pour off the KOH solution and rinse the roots well in a beaker using at least three complete changes of tap water or until no brown colour appears in the rinse water.
 - (c) Cover the roots with alkaline H_2O_2 at room temperature for 10 minutes or until roots are bleached.
 - (d) Rinse the roots thoroughly using at least three complete changes of tap water to remove the H_2O_2 .
 - (e) Cover the roots with 1 % HCl and soak for 3-4 minutes and then pour off the solution. DO NOT rinse after this step because the specimens must be acidified for proper staining.
 - (f) Incubate the roots with staining solution (0.01 % acid fuchsin in lactoglycerol or 0.05% trypan blue in lacto phenol) and keep them overnight for staining.
 - (g) Place the root specimens in glass petriplate /multiwell plate for destaining. The destaining solution (50% glycerol) is the standard used in step 4, but of course, without the stain.
- (4) Sample storage and slide preparation :— (1) If clearing and staining is not possible immediately then fresh roots can be kept moist and stored at 5 °C (for several days), or may be preserved in 50% ethanol for months together in tightly sealed vials.
- (2) Staining quality is subsequently improved by destaining roots in 50% glycerol for several months prior to observation to allow excess stain to leach from roots. Semi-permanent slides of stained roots can be made with PVLG mountant. For temporary slide the stained roots can be observed in plain lactoglycerol.

[F. No. 2-1/2010-Fert. Law]

SANJAY VIKRAM SINGH, Jt. Secy.

Foot Note :— The Fertiliser (Control) Order, 1985 was published in the Gazette of India, *vide* G.S.R. 758(E), dated the 25th September, 1985 and lastly amended *vide* S.O. No. 2024 (E), dated 17-8-2010.